



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN
MURBEI (*Morus alba*) TERHADAP *Escherichia coli***

SKRIPSI

Oleh

**Victoria Yosavin Jurian
NIM 121710101048**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN MURBEI
(*Morus alba*) TERHADAP *Escherichia coli***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Teknologi Hasil Pertanian (S1) dan mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian

Oleh

**VICTORIA YOSAVIN JURIAN
121710101048**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERSEMBAHAN

Saya persembahkan skripsi ini untuk :

1. Ibuku Vivin Sukarniati tercinta, terima kasih atas kasih sayang, cinta dan do'anya serta semangat yang luar biasa;
2. Almarhum ayah, menjadi motivasi yang luar biasa untuk selalu membuatnya tersenyum di Surga, sayang ayah selalu;
3. Kakakku Roberta Adjiviantoro yang selalu menjadi inspirasi dan adikku Viko Wahyu Triantoro yang menjadi motivasi untuk segera menyelesaikan pendidikan S1, sayang selalu untuk kalian;
4. Seluruh keluarga yang selalu memberikan doa, dukungan, bantuan dan semangat;
5. Almamater Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

MOTTO

“Allah akan mengangkat (derajat) orang-orang yang beriman di antaramu dan orang-orang yang yang diberi ilmu beberapa derajat”
(terjemahan Surat *Al-Mujadalah* ayat 11)^{*)}

Pendidikan tak pernah berhenti. Pendidikan adalah rangkaian pelajaran yang semakin lama malah semakin tinggi nilainya.^{**)}

^{*)} Departemen Agama Republik Indonesia. 2006. *Al Qur'an dan Terjemahannya*. Bandung : CV Penerbit Diponegoro.

^{**)} Sir Arthur Conan Doyle. 1994. *Salam Terakhir Sherlock Holmes (Terjemahan. Judul Asli: His Last Bow)*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Victoria Yosavin Jurian

NIM : 121710101048

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul **“Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Daun Murbei (*Morus alba*) terhadap *Escherichia coli*”** Adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali dalam kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan dalam institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta mendapatkan sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, November 2016

Yang menyatakan,

Victoria Yosavin Jurian

NIM 121710101048

SKRIPSI

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN MURBEI
(*Morus alba*) TERHADAP *Escherichia coli***

Oleh

Victoria Yosavin Jurian
NIM 121710101048

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Ir. Sony Suwasono, M. App. Sc.
Dosen Pembimbing Anggota : Ir. Mukhammad Fauzi, M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Daun Murbei (*Morus alba*) terhadap *Escherichia coli***” karya Victoria Yosavin Jurian NIM 121710101048 telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada:

Hari/tanggal : Senin, 24 Oktober 2016

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota,

Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc.
NIP. 196411091989021002

Ir. Mukhammad Fauzi, M.Si.
NIP. 196307011989031004

Tim
Penguji:

Ketua

Anggota

Dr. Yuli Witono, S.TP., M.P.
NIP. 1969121219980210001

Dr. Ir. Maryanto, M.Eng.
NIP. 195410101983031004

Mengesahkan
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian

Dr. Yuli Witono, S.TP, M.P.
NIP. 196912121998021001

RINGKASAN

Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Daun Murbei (*Morus alba*) terhadap *Escherichia coli*; Victoria Yosavin Jurian; 121710101048; 2016; 57 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Murbei merupakan tanaman yang dapat tumbuh secara liar di seluruh wilayah Indonesia namun kurang dimanfaatkan oleh masyarakat sekitar. Daun murbei memiliki beberapa efek farmakologis antara lain bersifat diuretik dan antihipertensi. Daun murbei mengandung senyawa bioaktif yang potensial seperti flavonoid, alkaloid dan polifenol. Senyawa bioaktif tersebut yang diharapkan memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri terhadap *Escherichia coli*.

Ekstraksi senyawa bioaktif daun murbei dilakukan menggunakan pelarut yang sesuai. Senyawa bioaktif dalam daun murbei merupakan senyawa polar yang dapat diekstrak menggunakan pelarut polar pula. Pelarut polar yang dapat digunakan adalah etanol dan air. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui rasio etanol dan air yang paling efektif untuk mengekstrak senyawa polifenol daun murbei yang selanjutnya dimanfaatkan sebagai antibakteri terhadap *Escherichia coli*.

Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahapan, tahap pertama yaitu penelitian pendahuluan untuk menentukan jenis sampel, tahap kedua yaitu pembuatan bubuk ekstrak daun murbei dan karakterisasi bubuk ekstrak meliputi analisis warna, total polifenol (*Follin-Ciocalteau*), serta aktivitas antioksidan (*DPPH scavenging activity*), dan tahap ketiga yaitu analisis aktivitas antibakteri menggunakan metode dilusi agar untuk penentuan konsentrasi hambat minimum dan IC_{50} .

Hasil penelitian menunjukkan pelarut etanol 100 % merupakan pelarut yang paling efektif dengan menghasilkan total polifenol ekstrak daun murbei tertinggi yakni sebesar 183,33 mg GAE/ml dan antioksidan sebesar 43,95 %. Pengujian aktivitas antibakteri metode dilusi agar menunjukkan bahwa ekstrak

daun murbei dapat berfungsi sebagai antibakteri dengan nilai KHM berdasarkan perhitungan kurva reguler sebesar 12,6 mg/ml dan IC_{50} sebesar 5,3 mg/ml. Nilai KHM berdasarkan perhitungan kurva logaritmik sebesar 11,43 mg/ml dan IC_{50} sebesar 3,44 mg/ml. Nilai KHM berdasarkan perhitungan kurva probit sebesar 11,37 mg/ml dan IC_{50} sebesar 4,50 mg/ml.



SUMMARY

Antioxidant and Antibacterial Activity of Mulberry (*Morus alba*) Leaf Extract against *Escherichia coli*; Victoria Yosavin Jurian; 121710101048; 2016; 57 pages; Department of Food and Agricultural Technology, Faculty of Agricultural Technology, University of Jember.

Mulberry is a plant that grows wild in all parts of Indonesia but it is rarely used by the Indonesian community. Mulberry leaf has some pharmacological effects, such as a diuretic and antihypertensive. Mulberry leaf contains potentially bioactive compounds such as flavonoids, alkaloids and polyphenols. Bioactive compounds are expected to have antioxidant and antibacterial activity against *Escherichia coli*.

Extraction of bioactive compounds from mulberry leaf is conducted using a suitable solvent. Bioactive compounds in mulberry leaf are polar compounds that can be extracted using a polar solvent. Polar solvents which can be used are ethanol and water. This study was conducted to determine the ratio of ethanol and water, and then the most effective ratio for mulberry leaf extract polyphenol compounds were subsequently used as an antibacterial against *Escherichia coli*.

This research was conducted in three stages, the first stage is a preliminary study to determine the type of sample, and the second stage is the production of extract powder of mulberry leaf. The final stage is the characterization of extract include color analysis, total polyphenols (*Folin-Ciocalteu*), and antioxidant activity (DPPH scavenging activity), and antibacterial activity using dilution method in order to determine the minimum inhibitory concentration and IC₅₀.

The results showed that 100% ethanol the most effective solvent resulting in the highest total polyphenol yield from mulberry leaf extract, providing the amount of 183.33 mg GAE / ml and antioxidants activity of 43.95%. Antibacterial activity test dilution method demonstrated that mulberry leaf extract can act as an antibacterial with MIC value based on the calculation of the regular curve of 12.6 mg / ml and IC₅₀ of 5.3 mg / ml. The MIC based on the calculation of the

logarithmic curve was 11.43 mg / ml and IC_{50} was 3.44 mg / ml. The MIC based probit curve calculations was 11.37 mg / ml and IC_{50} was 4.50 mg / ml.



PRAKATA

Rasa syukur kehadiran Allah SWT yang tak pernah lupa melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya yang luar biasa besar, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Daun Murbei (*Morus alba*) terhadap *Escherichia coli*” dengan baik. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari dukungan serta bantuan dari berbagai pihak. Oleh karenanya penulis menyampaikan rasa terima kasih yang teramat dalam kepada:

1. Dr. Yuli Witono, S.TP, M.P., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
2. Ir. Giyarto, M.Sc., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
3. Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc. selaku dosen pembimbing utama yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian dalam membimbing penelitian skripsi ini;
4. Ir. Mukhammad Fauzi, M.Si., selaku dosen pembimbing anggota yang telah memberikan arahan dan perbaikan dalam penyusunan skripsi ini;
5. Dr. Yuli Witono, S.TP., M.P. dan Dr. Ir. Maryanto, M.Eng., selaku tim penguji yang telah memberikan kritik, saran, serta bimbingan yang membangun dalam perbaikan penulisan skripsi ini;
6. Ibunda Vivin, Kakakku Roberta dan Adikku Viko serta keluarga penulis, terima kasih atas segala doa, kasih sayang, semangat dan motivasi yang tak terhingga dan sangat luar biasa;
7. Almarhum Ayah penulis yang menginspirasi penulis untuk segera menyelesaikan kuliah;

8. Teman-teman penelitian terkhusus Rizki Kurniawan, Shelvy Khadijah dan Nurus Zahro serta teman-teman lainnya terima kasih untuk semangat dan segala bantuannya pada saat penelitian hingga skripsi ini selesai;
9. Teman-teman THP A 2012 (CAZPER) terima kasih atas segala doa, semangat, bantuan dan motivasinya;
10. Teman-teman UKM-O SAHARA terima kasih atas cerita, segala doa, semangat, dan kasih sayang;
11. Keluarga, dan sahabat-sahabat THP dan TEP 2012 yang telah berbagi kisah, suka duka, dan pengalaman selama masa perkuliahan;
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah memberikan dukungan serta membantu pelaksanaan penelitian skripsi ataupun dalam penulisan skripsi sehingga dapat terselesaikan dengan baik.

Penulis sadar bahwa skripsi ini jauh dari kata sempurna dan memiliki banyak kesalahan. Penulis berharap kritik dan saran yang membangun dari pembaca demi sempurnanya tulisan ini. Semoga skripsi ini dapat menambah pengetahuan bagi pembaca.

Jember , November 2016

Penulis

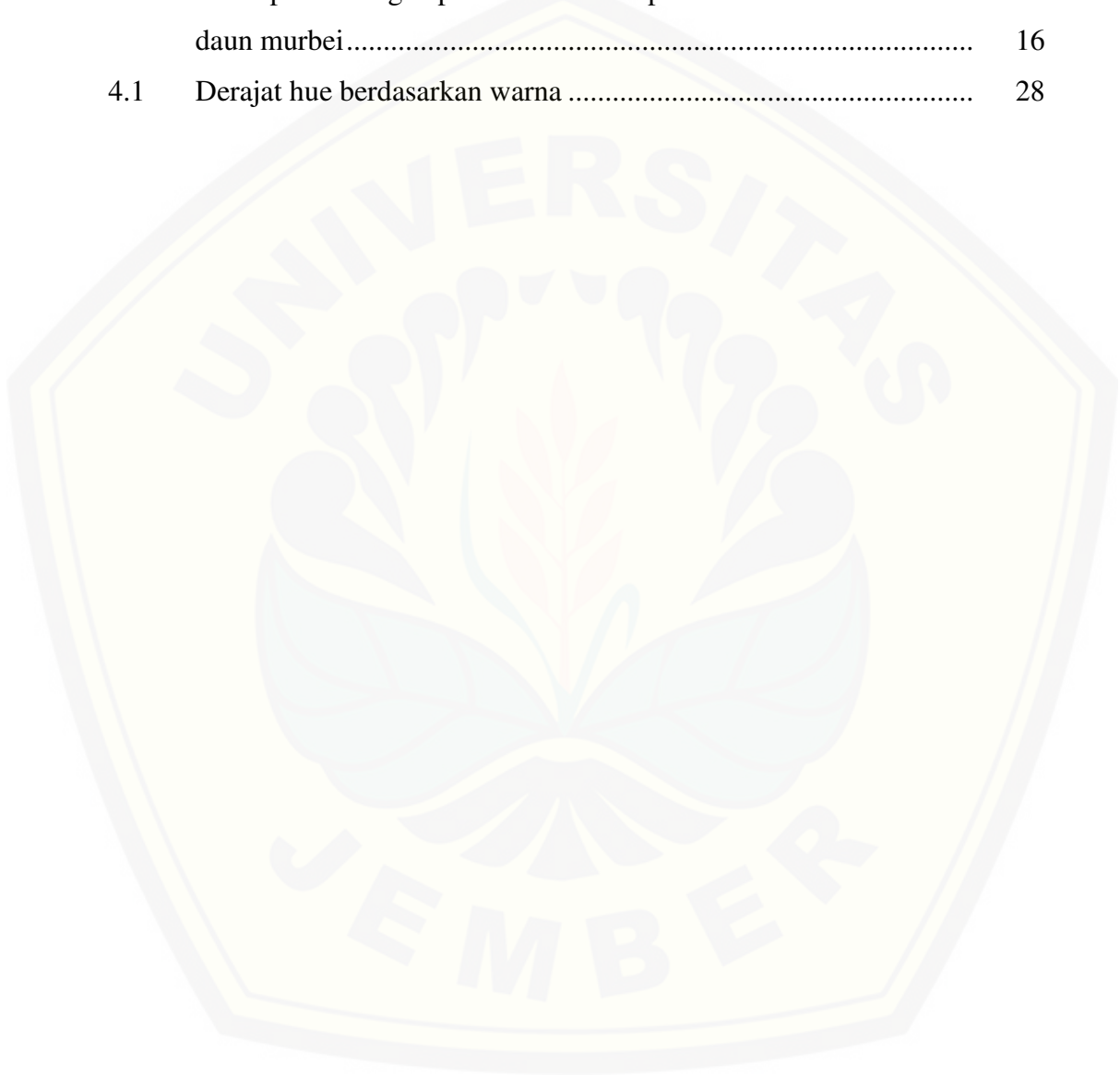
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
SUMMARY	ix
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Murbei	4
2.2 Bakteri <i>Escherichia coli</i>	6
2.3 Polifenol	7
2.4 Antioksidan	8
2.5 Antibakteri	9
2.6 Pengujian Aktivitas Antibakteri	11
2.6.1 Metode difusi sumur agar.....	11
2.6.2 Penentuan KHM dan KBM	11

BAB 3. METODE PENELITIAN	13
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	13
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	13
3.2.1 Bahan Penelitian.....	13
3.2.2 Alat Penelitian	13
3.3 Metode Penelitian	14
3.3.1 Pelaksanaan Penelitian	14
3.3.2 Prosedur Pengamatan	17
3.4 Analisa Data	22
BAB 4. PEMBAHASAN	23
4.1 Pemilihan Sampel Daun Murbei	23
4.1.1 Penentuan Jenis Daun Murbei.....	23
4.1.2 Penentuan Bentuk Sampel Daun Murbei	24
4.2 Warna Serbuk Ekstrak Daun Murbei	26
4.3 Total Polifenol Serbuk Ekstrak Daun Murbei	29
4.4 Identifikasi Senyawa Ekstrak Daun Murbei	31
4.5 Aktivitas Antioksidan Serbuk Ekstrak Daun Murbei	32
4.6 Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Murbei terhadap <i>Escherichia coli</i>	33
BAB 5. PENUTUP	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	44

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi senyawa polifenol daun murbei	5
3.1 Rasio perbandingan pelarut etanol-air pada ekstraksi daun murbei.....	16
4.1 Derajat hue berdasarkan warna	28

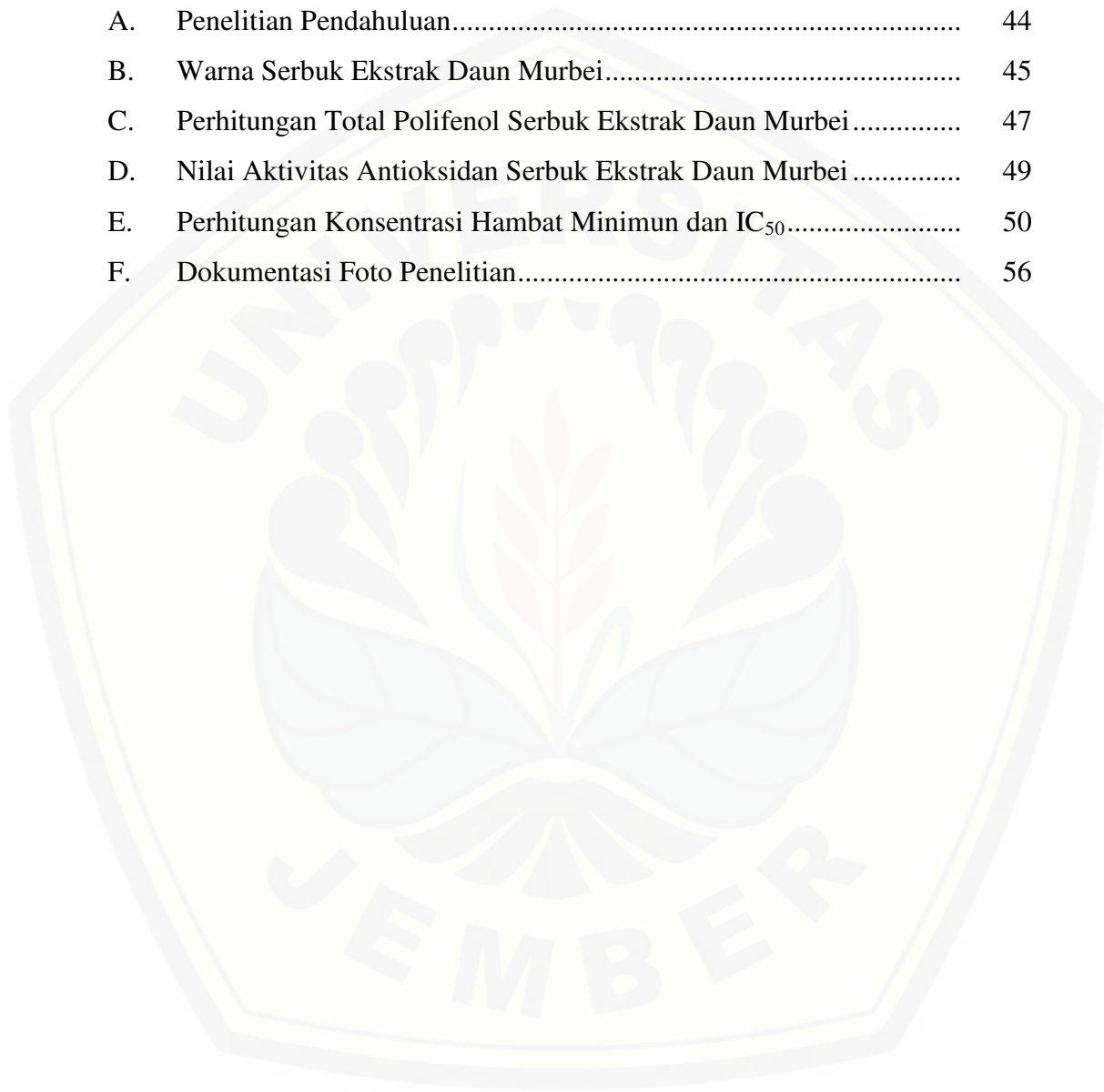


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1	Pohon murbei 4
2.2	Struktur dasar polifenol 8
3.1	Diagram alir pembuatan serbuk daun murbei 14
3.2	Ekstraksi dan uji total polifenol daun murbei (pendahuluan) 15
3.3	Diagram alir pembuatan serbuk ekstrak daun murbei..... 17
3.4	Diagram alir uji KHM dan IC ₅₀ 22
4.1	Jenis daun murbei..... 23
4.2	Kandungan total polifenol jenis daun murbei 24
4.3	Kandungan total polifenol jenis sampel daun murbei 25
4.4	Nilai kecerahan serbuk ekstrak daun murbei 27
4.5	Nilai derajat hue serbuk ekstrak daun murbei 28
4.6	Total polifenol serbuk ekstrak daun murbei..... 30
4.7	Kromatogram ekstrak daun murbei 31
4.8	Aktivitas antioksidan serbuk ekstrak daun murbei..... 32
4.9	Kurva hubungan penghambatan ekstrak daun murbei terhadap <i>Escherichia coli</i> menggunakan kurva reguler 34
4.10	Kurva hubungan penghambatan ekstrak daun murbei terhadap <i>Escherichia coli</i> menggunakan kurva logaritmik..... 35
4.11	Kurva hubungan penghambatan ekstrak daun murbei terhadap <i>Escherichia coli</i> menggunakan kurva probit..... 36

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Penelitian Pendahuluan.....	44
B. Warna Serbuk Ekstrak Daun Murbei.....	45
C. Perhitungan Total Polifenol Serbuk Ekstrak Daun Murbei.....	47
D. Nilai Aktivitas Antioksidan Serbuk Ekstrak Daun Murbei	49
E. Perhitungan Konsentrasi Hambat Minimum dan IC ₅₀	50
F. Dokumentasi Foto Penelitian.....	56



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan penelitian tumbuhan pada sisi aktivitas biologis seperti aktivitas antioksidan dan antibakteri menjadi perhatian yang menarik dalam upaya penggalian senyawa baru yang bermanfaat bagi kesehatan manusia dan manfaatnya di bidang pangan. Dalam kaitannya dengan manfaat di bidang kesehatan, antioksidan merupakan suatu senyawa yang mampu menghambat atau menunda terjadinya reaksi radikal bebas akibat adanya oksigen reaktif sehingga sifat tersebut menjadi penting dalam pencegahan berbagai penyakit, seperti kanker dan jantung koroner (Shui, 2002). Sedangkan dalam bidang pangan, ekstrak tanaman yang mengandung antioksidan dapat digunakan untuk mengawetkan bahan makanan (Martin, 2012). Selain itu, senyawa bioaktif pada tumbuhan diketahui memiliki peran dalam mekanisme pertahanan terhadap mikroorganisme dan serangga (Nurchayanti *et al.*, 2011).

Senyawa bioaktif pada tumbuhan seperti polifenol memiliki beberapa fungsi yaitu sebagai perlindungan terhadap mikroorganisme dan serangga, sebagai antioksidan, bertanggung jawab pada pembentukan warna, dan beberapa karakteristik organoleptik pada makanan (Albuquerque *et al.*, 2013). Salah satu tumbuhan yang memiliki senyawa bioaktif yang diduga memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri adalah murbei.

Murbei (*Morus alba* L.) merupakan tanaman yang dapat tumbuh secara liar di seluruh wilayah Indonesia (Sunanto, 2009). Daun murbei memiliki beberapa efek farmakologis antara lain bersifat diuretik, ant demam dan antihipertensi (Permadi, 2006). Kandungan senyawa aktif yang terdapat pada murbei yaitu alkaloida, flavonoida, dan polifenol (Sunanto, 2009). Anita *et al.* (2014) menyatakan bahwa ketiga senyawa tersebut dapat berperan sebagai antibakteri. Penelitian sebelumnya telah dilakukan oleh Hastuti *et al.* (2012) dan Musawwir (2014) yang menunjukkan bahwa ekstrak daun murbei dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*,

Salmonella thyphimurium, *Salmonella pullorum*, *Salmonella entertidis*, *Bacillus subtitis* dan *Bacillus cereus*.

Daun murbei diduga juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Bakteri ini merupakan salah satu penyebab diare (Rubenstein *et al.*, 2007; Arisman, 2009; Anies, 2005), dimana diare merupakan salah satu penyakit bawaan makanan yang terjadi pada negara berkembang (WHO, 2005). Data Riskesdas 2013 menunjukkan *period prevalence* diare pada seluruh kelompok umur berdasarkan gejala sebesar 7% dan pada balita sebesar 10,2% (Kementerian Kesehatan RI, 2014). Penyakit tersebut biasanya diatasi dengan menggunakan antibiotik sintetis. Antibiotik adalah zat yang menghancurkan atau menghalangi pertumbuhan mikroorganisme penyebab penyakit. Penggunaan antibiotik sintetis yang berlebihan dapat mengakibatkan resistensi bakteri (Martin, 2012). Efek terapi yang ditimbulkan antara lain efek samping, idiosinkrasi, alergi, fotosensitisasi, efek toksik dan efek teratogenik (Syamsuni, 2006). Alternatif untuk mengurangi konsumsi terhadap antibiotik sintetis perlu dilakukan yaitu dengan mengonsumsi antibiotik alami yang bersumber dari tumbuhan.

Berdasarkan hal tersebut, kandungan senyawa bioaktif daun murbei selain sebagai antioksidan alami diharapkan juga dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan diare yang selama ini menggunakan antibiotik sintesis yang memiliki efek terapi bagi kesehatan dan resistensi terhadap bakteri (Syamsuni 2006; Martin, 2012). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian mengenai aktivitas antioksidan dan antibakteri sebagai alternatif antibakteri alami untuk terapi penyembuhan terhadap penyakit diare yang disebabkan oleh mikroba patogen.

1.2 Perumusan Masalah

Murbei merupakan tanaman yang dapat tumbuh secara liar di seluruh wilayah Indonesia namun secara umum kurang dimanfaatkan oleh masyarakat sekitar. Daun murbei diduga memiliki senyawa bioaktif yang dapat berperan sebagai antioksidan dan antibakteri. Senyawa bioaktif tersebut perlu diekstrak untuk mengetahui konsentrasinya sebagai daya hambat terhadap bakteri patogen.

Jenis senyawa bioaktif yang terdapat pada daun murbei merupakan senyawa polar sehingga perlu diekstrak dengan menggunakan pelarut polar. Pelarut polar yang dapat digunakan adalah etanol dan air (Susanti, 2009). Rasio pelarut etanol dan air akan menentukan jumlah senyawa bioaktif yang dihasilkan, sehingga penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui rasio perbandingan pelarut etanol dan air yang digunakan untuk mengekstrak daun murbei. Penggunaan pelarut yang paling efektif mengekstrak senyawa bioaktif selanjutnya dimanfaatkan sebagai antibakteri. Selain itu, kemampuan daya hambat zat antibakteri dipengaruhi oleh konsentrasi ekstrak yang digunakan. Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukan penelitian aktivitas antibakteri dengan berbagai konsentrasi ekstrak daun murbei terhadap *Escherichia coli*.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

- a. Mengetahui konsentrasi pelarut yang efektif terhadap total polifenol ekstrak daun murbei
- b. Mengetahui konsentrasi pelarut yang efektif terhadap aktivitas antioksidan ekstrak daun murbei
- c. Mengetahui konsentrasi hambat minimum dan IC_{50} ekstrak daun murbei terhadap bakteri *Escherichia coli*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan memberikan informasi mengenai ekstrak daun murbei sebagai antioksidan alami dan antibakteri alami sebagai alternatif pengganti antibiotik sintesis terhadap *Escherichia coli*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Murbei

Murbei dengan nama latin *Morus alba* merupakan tumbuhan perdu yang berasal dari China, berkayu, tinggi dapat mencapai 9 meter, tumbuh baik pada ketinggian 100 m dpl dengan memerlukan cukup sinar matahari dan dapat tumbuh secara liar di hutan-hutan, ladang, daerah ketinggian dan tebing. Daun murbei memiliki bentuk bulat telur, segitiga atau berbentuk jantung, ujung runcing, pangkal tumpul, tepi bergerigi, kasar, warna hijau muda hingga hijau tua, dan panjang 2,5-20 cm dengan lebar 1,5 – 12 cm (Sunanto, 2009; Dalimartha, 2008). Pohon murbei dapat dilihat pada **Gambar 2.1**.



Gambar 2.1 Pohon murbei (Dokumentasi penulis)

Kandungan senyawa aktif yang terdapat pada daun murbei antara lain yaitu *ecdysterone*, *inokosterone*, *lupeol*, *b-sitosterol*, *rutin*, *moracetin*, *soquersetin*, *scopoletin*, *scopolin*, *alfa* dan *beta-hexenal*, *cis-g-hexenol*, *benzaldehyde*, *eugenol*, *linalol*, *benzyl alkohol*, *butylamine*, *acetone*, *trigonelline*, *choline*, adenin, asam amino, *copper*, *zinc*, vitamin (A, B dan C), karoten, asam klorogenik, asam fumarat, asam folat, *formyltetrahydrofolik acid*, *mioinositol*, dan *phytoestrogens* (Hariana, 2008; Dalimartha, 2008). Menurut Permadi (2006), kandungan kimia tanaman murbei antara lain alkaloida, flavonoida dan polifenol. Senyawa polifenol dalam daun murbei dapat dilihat pada **Tabel 2.1**.

Tabel 2.1 Komposisi senyawa polifenol daun murbei

No.	Senyawa Polifenol	Jumlah (mg/100 g)
1.	<i>1- Caffeoylquinnic acid</i>	58.66 ± 0,24
2.	<i>Caffeic acid</i>	1584,01 ± 4,24
3.	<i>5-Caffeoylquinnic acid</i>	1381,54 ± 0,74
4.	<i>4-Caffeoylquinnic acid</i>	124,77 ± 0,16
5.	<i>Quercetin-3-O-rhamnoside -7-O-glucoside</i>	272,83 ± 0,23
6.	<i>Quercetin-3,7-D-O-β-D-glucopyranoside</i>	137,93 ± 0,021
7.	<i>Kaempferol-7-O-glucoside</i>	211,46 ± 0,028
6.	<i>Rutin</i>	194,23 ± 0,54
9.	<i>Quercetin-3-O-glucoside</i>	972,48 ± 0,014
10.	<i>Quercetin-3-O-(6-malonyl)- β -D-glucopyranoside</i>	1258,71 ± 0,13
11.	<i>Quercetin-3-O-glucoside-7-O-rhamnoside</i>	849,18 ± 0,12
12.	<i>Kaempferol-3-Oglucopyranosyl-(1,6)- β -Dglucopyranoside</i>	616,32 ± 0,34
13.	<i>Kaempferol-3-O-(6 malonyl)glucoside</i>	1333,33 ± 0,42
	Total <i>phenolic acids</i>	3148,98 ± 0,014
	Total <i>flavonols</i>	5846,51 ± 0,21
	Total	8995,486 ± 0,06

Sumber : Thabti *et al.* (2012)

Daun murbei memiliki beberapa efek farmakologis antara lain bersifat diuretik, antipiretik dan antihipertensi (Permadi, 2006). Khasiat lain dari daun murbei antara lain penyakit-penyakit flu, malaria, sakit kepala, sakit tenggorokan, sakit gigi, rematik, darah tinggi (hipertensi), kencing manis (diabetes mellitus), kaki gajah, sakit kulit, bisul, radang mata merah, memperbanyak air susu ibu (ASI), keringat malam, muntah darah dan batuk darah akibat demam, kolesterol tinggi dan gangguan pada saluran pencernaan (Dalimartha, 2008; Hariana 2008).

Hasil penelitian Hastuti *et al.* (2012) menunjukkan bahwa daun murbei dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae*. Menurut Hastuti *et al.* (2012) ekstrak daun murbei mengandung quersetin dan anthosianin yang merupakan senyawa glikosida flavonoid golongan fenol yang berperan sebagai koagulator protein. Penelitian lain yang dilakukan oleh Musawwir (2014) menunjukkan bahwa daun murbei dapat menghambat pertumbuhan *Salmonella typhimurium*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus*.

2.2 Bakteri *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah salah satu bakteri patogen yang merupakan bakteri gram negatif dan berbentuk batang pendek dengan panjang 1,0 – 3,0 μm dan lebar 0,4-0,7 μm . Bakteri ini tidak memiliki kapsula dan dapat bergerak aktif. *Escherichia coli* pada umumnya diketahui terdapat secara normal dalam alat pencernaan manusia dan hewan (Nurwanto dan Djarijah, 1997).

Dinding sel pada bakteri *Escherichia coli* (gram negatif) yaitu terdiri dari peptidoglikan dan membran luar. Dinding sel ini sebagai proteksi terhadap tekanan osmotik internal yaitu pada kisaran 5-20 atm dan berperan pada pembelahan sel serta bersifat permeabel non selektif (Brooks *et al.*, 2007). Membran luar ekstrasitoplasmik bakteri gram negatif (Fauci *et al.*, 2008) mampu menghambat perpindahan molekul berukuran besar (Brooks *et al.*, 2007). Membran luar bakteri gram negatif merupakan suatu lipid bilayer dengan protein,

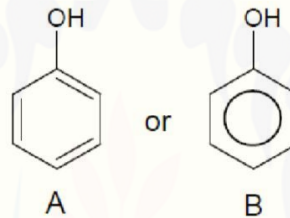
lipoprotein dan polisakarida. Variasi membran luar dapat menyebabkan adanya perbedaan sifat patogenitas dan resistensi antimikroba (Fauci *et al.*, 2008).

Escherichia coli merupakan bakteri yang dapat menyebabkan penyakit diare. Mekanisme terjadinya diare oleh bakteri *Escherichia coli* yaitu dengan produksi enterotoksin yang secara tidak langsung dapat menyebabkan kehilangan cairan dan invasi (bakteri masuk ke dalam sel inang/jaringan dan menyebar ke seluruh tubuh) yang sebenarnya lapisan epitelium dinding usus, yang menyebabkan peradangan dan kehilangan cairan. *Escherichia coli* memproduksi enterotoksin ST (toksin yang mantap panas) dan LT (toksin yang labil panas). Invasi langsung lapisan sel epitelium dinding usus dimungkinkan karena pengaruh beracun lipopolisakarida (endotoksin) (Volk dan Wheeler, 1989). Tim Mikrobiologi FK Unibraw (2010) menyatakan bahwa, *Escherichia coli* merupakan organisme penghuni utama usus besar dan juga merupakan isolat penyebab utama infeksi saluran kemih dan luka infeksi, pneumonia, meningitis serta septicemia serta menyebabkan beberapa penyakit gastrointestinal. Mekanisme patogenik *Escherichia coli* salah satunya adalah melibatkan produksi berbagai macam enterotoksin, dimana sasaran dari enterotoksin tersebut adalah usus kecil, dan hasilnya berupa diare sebagai akibat dari pengeluaran cairan dan elektrolit.

2.3 Polifenol

Polifenol adalah kelompok fitokimia unik yang terdapat dalam buah-buahan, sayuran dan tanaman lain serta bertanggung jawab dalam pembentukan pigmen alami pada buah, sayuran dan tanaman (Watson *et al.*, 2013; Godstime *et al.*, 2014). Struktur polifenol terdiri dari satu atau lebih unit fenol (Lima *et al.*, 2014). Senyawa fenolik memiliki setidaknya satu cincin aromatik dengan satu atau lebih kelompok hidroksil dan diklasifikasikan sebagai flavonoid dan non flavonoid (Del Rio *et al.*, 2013). Polifenol merupakan kelompok fungsional yang mampu menerima muatan negatif radikal bebas (Watson *et al.*, 2013). Polifenol merupakan senyawa bioaktif yang bersifat polar

Polifenol pada tanaman memiliki beberapa fungsi yaitu sebagai perlindungan terhadap mikroorganisme dan serangga, antioksidan, bertanggung jawab pada pembentukan warna, dan beberapa karakteristik organoleptik pada makanan (Albuquerque *et al.*, 2013). Kandungan polifenol tumbuhan dan makanan tergantung pada banyak faktor lingkungan dan pengolahan, termasuk paparan sinar matahari, hujan, tingkat kematangan, penyimpanan, dan metode pengolahan pangan (Watson *et al.*, 2013). Degradasi polifenol dapat dihindari dengan penggunaan sampel yang kering atau beku, hal ini dikarenakan sampel yang memiliki kelembaban atau kadar air dapat membantu aktivasi enzim (Tsao, 2010). Struktur dasar polifenol dapat dilihat pada **Gambar 2.2**.



Gambar 2.2 Struktur dasar polifenol (Sumber: Albuquerque *et al.*, 2013)

2.4 Antioksidan

Senyawa antioksidan secara kimia adalah senyawa pemberi elektron (elektron donor). Secara biologis, pengertian antioksidan adalah senyawa yang dapat menangkal atau meredam dampak negatif oksidan. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat di hambat. Antioksidan dibutuhkan tubuh untuk melindungi tubuh dari serangan radikal bebas. Antioksidan adalah suatu senyawa atau komponen kimia yang dalam kadar atau jumlah tertentu mampu menghambat atau memperlambat kerusakan akibat proses oksidasi (Sayuti dan Yenrina, 2015).

Antioksidan penting untuk mempertahankan mutu produk pangan serta kesehatan dan kecantikan. Pada bidang kesehatan dan kecantikan, antioksidan berfungsi untuk mencegah penyakit kanker dan tumor, penyempitan pembuluh darah, penuaan dini, dan lain-lain. Antioksidan juga mampu menghambat reaksi

oksidasi dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif sehingga kerusakan sel dapat dicegah. Reaksi oksidasi dengan radikal bebas sering terjadi pada molekul protein, asam nukleat, lipid dan polisakarida. Bidang industri pangan, antioksidan dapat digunakan untuk mencegah terjadinya proses oksidasi yang dapat menyebabkan kerusakan, seperti ketengikan, perubahan warna dan aroma, serta kerusakan fisik lainnya. Antioksidan sangat penting sebagai inhibitor peroksidasi lipid sehingga bisa digunakan untuk mencegah terjadinya peroksidasi lipid pada bahan pangan (Tamat *et al.*, 2007).

Aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh banyak faktor seperti kandungan lipid, konsentrasi antioksidan, suhu, tekanan, oksigen, dan komponen kimia dari makanan secara umum seperti protein dan air. Proses penghambatan antioksidan berbeda-beda tergantung dari struktur kimia dan variasi mekanisme. Dalam mekanisme ini yang paling penting adalah reaksi dengan radikal bebas lipid, yang membentuk produk non-aktif (Gordon *et al.*, 2001).

Polifenol adalah salah satu antioksidan alami yang terdapat pada pigmen sayuran dalam kutikul poliar dan sel epidermik daun. Senyawa fenolik mempunyai berbagai efek biologis seperti aktivitas antioksidan melalui mekanisme sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengkhelat logam, peredam terbentuknya singlet oksigen serta pendonor elektron. Senyawa flavonoida adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan di alam. Flavonoid memberikan kontribusi pada aktivitas antioksidannya secara *in vitro* dengan cara flavonoid mengikat (kelasi) ion-ion metal seperti Fe dan Cu. Ion-ion metal seperti Cu dan Fe ini, dapat mengkatalisis reaksi yang akhirnya memproduksi radikal bebas (Sayuti dan Yenrina, 2015).

2.5 Antibakteri

Antibakteri adalah obat atau senyawa kimia yang digunakan untuk membasmi bakteri, khususnya bakteri yang bersifat merugikan manusia. Beberapa istilah yang digunakan untuk menjelaskan proses pembasmian bakteri yaitu germisid, bakterisid, bakteristatik, antiseptik, desinfektan (Aulia, 2008).

Antibakteri merupakan sifat dari suatu bahan yang menunjukkan efek penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri. Penghambatan pertumbuhan bakteri dibedakan menjadi 2 sifat, yaitu bakterisidal dan bakteriostatik. Suatu bahan disebut bersifat bakterisidal jika mampu membunuh bakteri, sedangkan sifat bakteriostatik hanya menghambat pertumbuhan bakteri. Bahan antibakteri dapat bersifat bakteriostatik pada konsentrasi rendah, namun bersifat bakterisidal pada konsentrasi tinggi (Lay, 1994).

Faktor yang mempengaruhi aktivitas antimikroba adalah pH lingkungan, komponen medium, stabilitas obat, ukuran inokulum, lama inkubasi dan aktivitas metabolik mikroorganisme (Brooks *et al.*, 2004). Menurut Pelczar dan Chan (2005), keadaan yang mempengaruhi kerja antimikrobia adalah konsentrasi atau intensitas zat antimikrobia, jumlah mikroorganisme, suhu, spesies mikroorganisme, adanya bahan organik dan keasaman atau kebasaan (pH).

Zat antibakteri memiliki beberapa mekanisme kerja, antara lain adalah sebagai berikut :

- a. Kerusakan pada dinding sel, struktur dinding sel dapat rusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk. Obat antibakteri yang menghambat pembentukan dinding sel, efektif pada saat bakteri sedang aktif membelah.
- b. Perubahan permeabilitas sel, membran sitoplasma mempertahankan bahan-bahan tertentu di dalam sel, mengatur aliran keluar-masuknya bahan-bahan lain serta memelihara integritas komponen-komponen selular. Kerusakan pada membran ini akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel.
- c. Perubahan molekul protein dan asam nukleat, hidupnya suatu sel bergantung pada terpeliharanya molekul-molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alamiahnya. Suatu kondisi atau substansi yang mengubah keadaan ini, yaitu mendenaturasikan protein dan asam-asam nukleat dapat merusak sel tanpa dapat diperbaiki kembali. Penghambatan kerja enzim, setiap enzim dari beratus-ratus enzim berbeda-beda yang ada di dalam sel merupakan sasaran potensial bagi bekerjanya suatu penghambat. Banyak zat kimia telah diketahui

dapat mengganggu reaksi biokimiawi. Penghambatan ini dapat mengakibatkan terganggunya metabolisme atau matinya sel.

- d. Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein, DNA, RNA dan protein memegang peranan amat penting dalam proses kehidupan normal sel. Hal itu berarti bahwa gangguan apapun yang terjadi pada pembentukan atau pada fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel (Pelczar dan Chan, 2005; Betsy dan Keogh, 2005; Brooks *et al.*, 2004). Dasar toksitas selektif dari antibakteri yang menghambat sintesis protein adalah struktur ribosom. Antibakteri dapat menghambat sintesis mRNA pada proses transkripsi atau menghambat replikasi DNA pada proses pembelahan sel (tim Mikrobiologi FK, Unibraw, 2010).

2.6 Pengujian Aktivitas Antibakteri

2.6.1 Metode difusi sumur agar

Disc diffusion test atau uji difusi disk dilakukan dengan mengukur diameter zona bening (*clear zone*) yang merupakan petunjuk adanya respon penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri dalam ekstrak. Syarat jumlah bakteri untuk uji kepekaan/sensitivitas yaitu 10^5 - 10^8 CFU/mL (Hermawan dalam Dewi, 2010).

Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan. Metode difusi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode silinder, metode lubang/sumuran dan metode cakram kertas. Metode lubang/sumuran yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diinjeksikan dengan ekstrak yang akan diuji. Setelah dilakukan inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang (Kusmayati dan Agustini dalam Dewi, 2010).

2.6.2 Penentuan KHM dan KBM

Metode untuk mengukur kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM) yaitu dengan menggunakan metode dilusi. Metode dilusi terdiri

dua macam yakni dilusi cair dan dilusi padat. Cara yang dilakukan pada dilusi cair adalah dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Seri tabung diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Metode dilusi padat dilakukan hal yang sama, namun dengan menggunakan media padat dan menggunakan cawan petri dengan menghitung jumlah koloni mikroba yang tumbuh. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah inkubasi dan media yang memiliki pertumbuhan koloni paling sedikit ditetapkan sebagai KBM (Pratiwi, 2008; Tim Mikrobiologi FK Unibraw, 2010; Behrman *et al.*, 1999).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Manajemen Agroindustri, Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian, dan Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Waktu penelitian yaitu dari bulan Februari sampai Juli 2016.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah daun murbei yang diperoleh dari Agrotechnopark Universitas Jember, kultur bakteri *Escherichia coli* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, etanol 96%, aquades, NA (*Nutrient Agar*) (Merck), NB (*Nutrient Broth*) (Merck), asam galat, reagen *Folin-Ciocalteu*, Na_2CO_3 , DPPH (*1,1-diphenyl-1-2-Picrylhidroksil*), DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) 2 % (Merck), dan NaCl 0,85%.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah inkubator (Heraeus Inst B6200, Jerman), autoklaf (Hirayama HL 36, Jepang), *laminar air flow* (Crumair, Spanyol), *colony counter* (Stuart Scientific), *blender* (Miyako, Indonesia), *shaker waterbath* (Memmert D-91126, Jerman), *rotary evaporator* (Butchi, Jerman), *oven vacuum* (Lab-line Instruments), *colour reader* (CR-10 Minolta), neraca analitik (Ohaus, USA), penangas (Medline MS300HS, Jerman), spektrofotometer (Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS, China), alat LC-MS (Shimadzu LC-MS 2020), *magnetic stirrer* (Medline MS300HS, Jerman), *vortex* (Medline VM-3000-MD, Jerman), pipet mikro (Biohit 12636255, Jerman), cawan petri, bunsen, penangas listrik, jarum ose, botol semprot, spatula, *blue tip*, *yellow tip*, oven (Labtech LDO-080N, Korea), dan peralatan gelas.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Pelaksanaan Penelitian

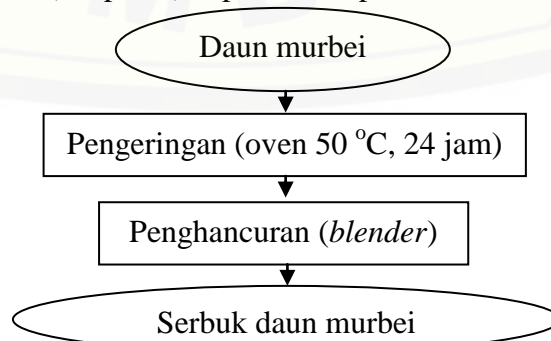
Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan pengukuran sebanyak 3 kali ulangan. Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap antara lain :

a. Tahap pertama

Penelitian tahap pertama adalah penelitian pendahuluan untuk menentukan jenis daun yang digunakan untuk penelitian utama. Langkah awal yaitu penentuan jenis daun murbei, yakni daun muda dan tua. Daun muda dan tua yang digunakan adalah daun segar yang dipetik dari pohon murbei selanjutnya diekstraksi dan dilakukan pengukuran nilai total polifenol. Setelah mengetahui nilai total polifenol yang lebih tinggi, maka akan dilakukan pengukuran nilai total polifenol dengan jenis sampel berbeda yang digunakan yaitu sampel segar (daun yang dipetik dan diekstraksi) dan kering (daun yang dipetik dikeringkan terlebih dahulu dan dihaluskan). Sampel yang memiliki nilai total polifenol tertinggi akan digunakan untuk uji aktivitas antioksidan dan antibakteri. Pembuatan serbuk daun murbei dan ekstraksi daun murbei adalah sebagai berikut:

1) Pembuatan serbuk ekstrak daun murbei

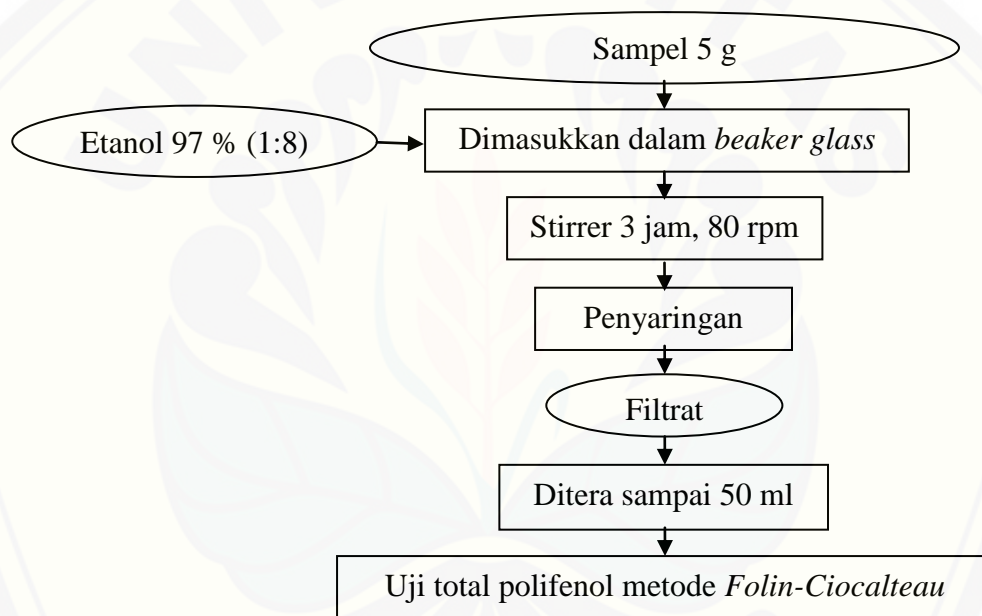
Daun murbei yang memiliki nilai total polifenol tertinggi dari jenis daun muda dan tua dilakukan pengeringan dengan menggunakan oven pada suhu 50 °C selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan penghancuran dengan menggunakan *blender* sehingga didapatkan serbuk daun murbei. Pembuatan serbuk daun murbei (simplisia) dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Diagram alir pembuatan serbuk daun murbei

2) Ekstraksi daun murbei dan uji total polifenol

Ekstraksi dan uji total polifenol dilakukan pada semua jenis sampel. Sampel daun murbei sebanyak 5 gram dimasukkan kedalam *beaker glass* dan dilakukan penambahan etanol 97 % dengan perbandingan 1 : 8 kemudian ditutup dengan menggunakan alumunium foil. Selanjutnya di stirer selama 3 jam dengan kecepatan 80 rpm dan dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring Whatman nomor 40 sehingga didapatkan filtratnya. Filtrat yang diperoleh ditera dengan etanol 97 % hingga 50 ml. Ekstraksi daun murbei dapat dilihat pada **Gambar 3.2**.



Gambar 3.2 Ekstraksi dan uji total polifenol daun murbei (pendahuluan)

b. Tahap Kedua

Tahap kedua penelitian ini adalah pembuatan serbuk polifenol ekstrak daun murbei dengan perlakuan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi dan karakterisasi serbuk polifenol ekstrak daun murbei dengan melakukan analisis terhadap warna serbuk, total polifenol, analisa LC-MS dan aktivitas antioksidan. Serbuk daun murbei yang digunakan adalah serbuk yang memiliki nilai total polifenol tertinggi yang diperoleh dari penelitian tahap pertama.

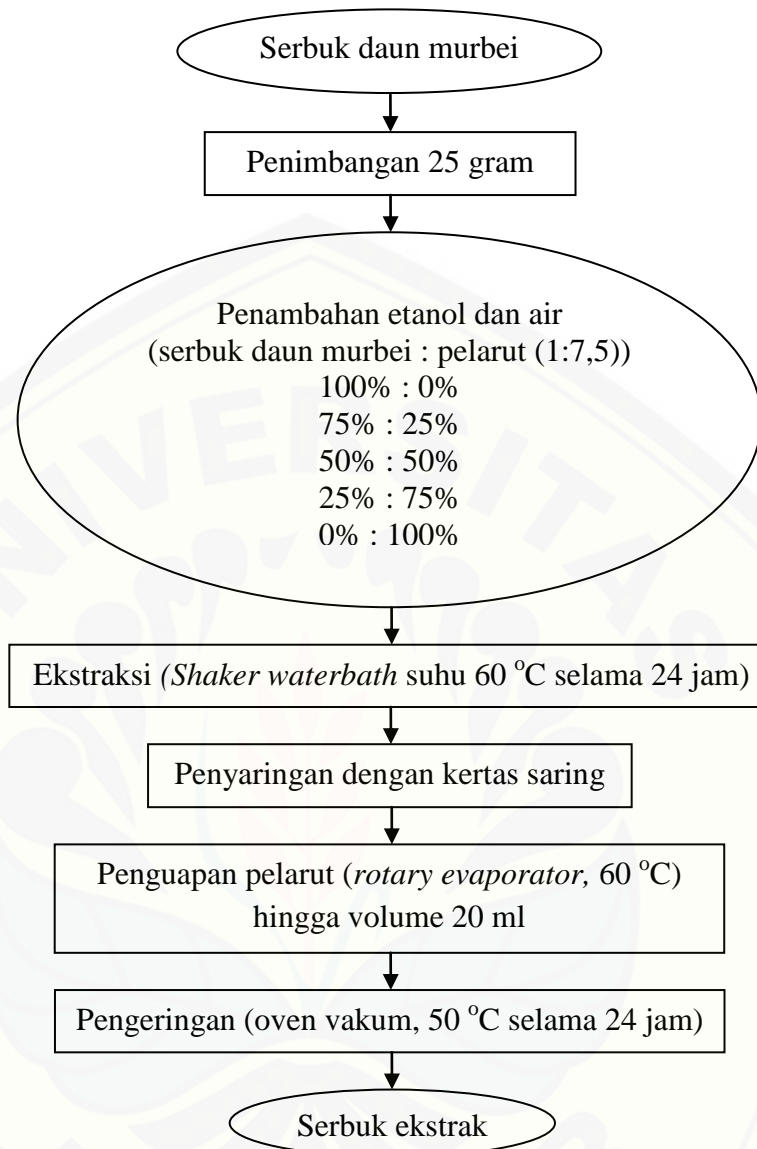
Pembuatan ekstrak daun murbei dilakukan dengan cara penimbangan serbuk daun murbei sebanyak 25 gram. Serbuk daun murbei tersebut dilakukan penambahan pelarut dengan perbandingan (1:7,5) sehingga didapat ekstrak. Pelarut yang digunakan adalah etanol dan air dengan rasio perbandingan dapat dilihat pada **Tabel 3.1**. Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan menggunakan shaker waterbath pada suhu 60 °C selama 24 jam. Ekstrak yang didapat kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60 °C hingga volume 20 ml. Ekstrak pekat yang diperoleh dilakukan pengeringan dengan menggunakan oven vakum pada suhu 50 °C selama 24 jam sehingga didapatkan serbuk ekstrak daun murbei (Anita *et al.*, 2014). Diagram alir pembuatan ekstrak daun murbei dapat dilihat pada **Gambar 3.3**.

Tabel 3.1 Rasio perbandingan pelarut etanol-air pada ekstraksi daun murbei

Etanol (%)	Air (%)
100	0
75	25
50	50
25	75
0	100

c. Tahap ketiga

Penelitian tahap ketiga yaitu uji penghambatan ekstrak daun murbei terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan metode dilusi media padat untuk penentuan nilai KHM (Kadar Hambat Minimum) dan IC₅₀ (*Inhibition Concentration*). Uji penghambatan bakteri dilakukan tahapan persiapan dengan pembuatan media dan peremajaan bakteri *Escherichia coli* terlebih dahulu.



Gambar 3.3 Diagram alir pembuatan serbuk ekstrak daun murbei

3.3.2 Prosedur Pengamatan

a. Warna serbuk ekstrak daun murbei (Hutching, 1999)

Pengukuran warna serbuk ekstrak daun murbei dilakukan dengan menggunakan *colour reader* CR-10 Minolta. Prinsip dari alat *colour reader* adalah pengukuran perbedaan warna melalui pantulan cahaya oleh permukaan sampel. Tiap sampel terdiri dari 3 ulangan dan pengukuran dilakukan pada 5 titik berbeda. Pengukuran warna dilakukan dengan cara adalah menghidupkan *colour reader* dengan menekan tombol *power*. Lensa diletakkan pada porselen

standar secara tegak lurus dan menekan tombol “Target” maka muncul nilai L, a dan b pada layar yang merupakan nilai standarisasi. Hal yang sama juga dilakukan pada sampel serbuk ekstrak daun murbei dengan cara meletakkan lensa secara tegak lurus pada sampel kemudian menekan tombol “Target” sehingga muncul nilai dE, dL, da, dan db pada layar. Pada *colour reader* yang diamati adalah nilai kecerahan warna (L).

Dimana : L = 0 (gelap)

L = 100 (cerah)

a* = standar a + da

b* = standar b + db

H = $\arctan \frac{a^*}{b^*}$

H = $180 - \tan^{-1} b/a$ (jika a positif dan b positif)

= $180 + \tan^{-1} b/a$ (jika a negatif dan b positif)

= $180 - \tan^{-1} b/a$ (jika a negatif dan b negatif)

Jika hasil :

18-54° : maka produk berwarna *red* (R)

54-90° : maka produk berwarna *yellow red* (YR)

90-126° : maka produk berwarna *yellow* (Y)

126-162° : maka produk berwarna *yellow green* (YG)

162-198° : maka produk berwarna *green* (G)

198-234° : maka produk berwarna *blue green* (BG)

234-270° : maka produk berwarna *blue* (B)

270-306° : maka produk berwarna *blue purple* (P)

342-418° : maka produk berwarna *red purple* (RP)

- b. Total polifenol serbuk ekstrak daun murbei (Metode *Folin-Ciocalteu*) (Singleton dan Rossi, 1965).

Pembuatan kurva standar untuk perhitungan polifenol dibuat dengan cara menggunakan larutan asam galat konsentrasi. Pembuatan asam galat pada konsentrasi (0; 125; 250; 500; 1000; 2000; 4000; 8000) μM , lalu diambil 0,04 ml dalam 8 tabung reaksi berbeda dan masing masing ditambahkan 0,8 ml reagen *Folin-Ciocalteu* yang telah diencerkan 10 kali pada masing-masing tabung reaksi. Kemudian divortex dan didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,8 ml larutan Na_2CO_3 7% dan 0,36 ml aquades (total volume 2 ml). Tabung reaksi yang berisi larutan kurva standar tersebut ditutup dengan aluminium foil dan didiamkan ditempat gelap selama 60 menit, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 765 nm.

Penentuan total polifenol ekstrak daun murbei dilakukan cara penimbangan sampel sebanyak 0,02 gram yang dimasukkan ke dalam labu takar dan dilarutkan dalam labu takar 10 ml dengan aquades. Sebanyak 0,04 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 0,8 ml reagen *Folin-Ciocalteu* yang telah diencerkan 10 kali. Sampel tersebut divortex dan didiamkan selama 5 menit, selanjutnya ditambahkan 0,8 ml Na_2CO_3 dan ditambahkan aquades hingga volume 2 ml kemudian divortex. Sampel dalam tabung reaksi tersebut ditutup dengan menggunakan aluminium foil dan didiamkan selama 120 menit. Setelah diinkubasi selama 120 menit, dilakukan pengukuran nilai absorbansi pada panjang gelombang 765 nm.

Analisa kandungan total polifenol pada sampel dihitung berdasarkan kurva standar asam galat yang diperoleh. Nilai absorbansi (y) dimasukkan pada persamaan kurva standar asam galat, sehingga diperoleh nilai (x) yang kemudian dikali faktor pengenceran kemudian dikonversi berat molekul asam galat.

c. Identifikasi komponen ekstrak menggunakan LC-MS

Sampel yang memiliki total polifenol paling tinggi diidentifikasi menggunakan LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectra*). Sampel diinjeksi pada konsentrasi 1000 ppm, sebanyak 5 μl pada alat Shimadzu LC-MS 2020 dengan kondisi fase gerak gradient pada menit ke 0 *mobile phase B* 0%, pada menit ke-60 *mobile phase B* 100%. *Column* yang digunakan ada dua, pada *column* 1 yaitu Shim-Pack GVP-ODS (5L x 2,0), *column* 2 yaitu Shim-Pack VP-ODS (250L x 4,6). *Mobile phase A* yaitu *water formic acid* 0,1%, *mobile phase B* yaitu *acetonitrile*. Kecepatan alir sampel sebesar 0,3ml/menit pada suhu 30°C. Data yang dihasilkan berupa *scan* berat molekul setiap zat yang terkandung di dalam sampel.

d. Aktivitas antioksidan (metode DPPH (*1,1-diphenyl-1-2-Picrylhidroksil*))

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH yaitu salah satu senyawa radikal bebas yang memiliki nitrogen tidak stabil dengan absorbansi maksimal dengan panjang gelombang 517 nm dan berwarna biru gelap. Serbuk ekstrak daun murbei sebanyak 0,04 gram

dilarutkan dalam 10 ml etanol. DPPH disiapkan dengan melarutkannya ke dalam etanol konsentrasi 0,1567 mg/ml dengan cara dilakukan penimbangan DPPH sebanyak 0,01576 gram, dimasukkan dalam *beaker glass* dan ditambahkan etanol hingga volume 100 ml. Sebanyak 0,1 ml sampel yang telah diencerkan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,9 ml etanol dan 2 ml DPPH. Selanjutnya divortex dan didiamkan selama 15 menit dengan ditutup menggunakan aluminium foil dan ditempatkan di tempat gelap. Setelah didiamkan selama 15 menit, diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Blanko dibuat dengan cara mengganti sampel dengan etanol dan dilakukan dengan tahapan yang sama seperti pengukuran sampel. Aktivitas antioksidan dihitung dengan rumus:

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100 \%$$

- e. Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun murbei terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan metode dilusi agar.

Metode dilusi agar dilakukan dengan cara penentuan nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan *Inhibition Concentration* (IC₅₀) ekstrak daun murbei terhadap bakteri *Escherichia coli*. Uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode dilusi agar terdiri dari beberapa tahapan sebagai berikut :

- 1) Sterilisasi alat dan bahan

Semua peralatan yang telah dicuci bersih, dikeringkan dan dibungkus kertas, serta bahan-bahan (kecuali ekstrak polifenol) yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C (Dwidjoseputro, 1990).

- 2) Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA)

Media NA sebanyak 2,4 g dilarutkan dalam 120 ml aquades steril yang telah dihangatkan kedalam tabung erlenmeyer. Campuran dididihkan diatas *hotplate magnetic* sampai benar-benar larut. Larutan media NA disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

3) Pembuatan media *Nutrient Broth* (NB)

Media NB sebanyak 0,08 g dilarutkan dalam 10 ml aquades steril tanpa pemanasan, diaduk sampai benar-benar larut. Larutan media NB distrerilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

4) Pembuatan larutan fisiologi NaCl 0,85%

Sebanyak 0,85 g serbuk NaCl dilarutkan dalam 100 ml aquades steril. Kemudian distrerilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

5) Pembuatan suspensi mikroba

Sebanyak 1 ose *Escherichia coli* dari kultur stok agar miring NA diambil menggunakan ose steril kemudian dimasukkan kedalam endroff yang berisi 1 ml media NB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil inkubasi dibuat seri pengenceran dengan cara mencampurkan 1 ml media NB yang telah diinkubasi dengan 9 ml NaCl 0,85% sampai pengenceran 10^{-5} (Pratiwi, 2008).

6) Pembuatan larutan uji

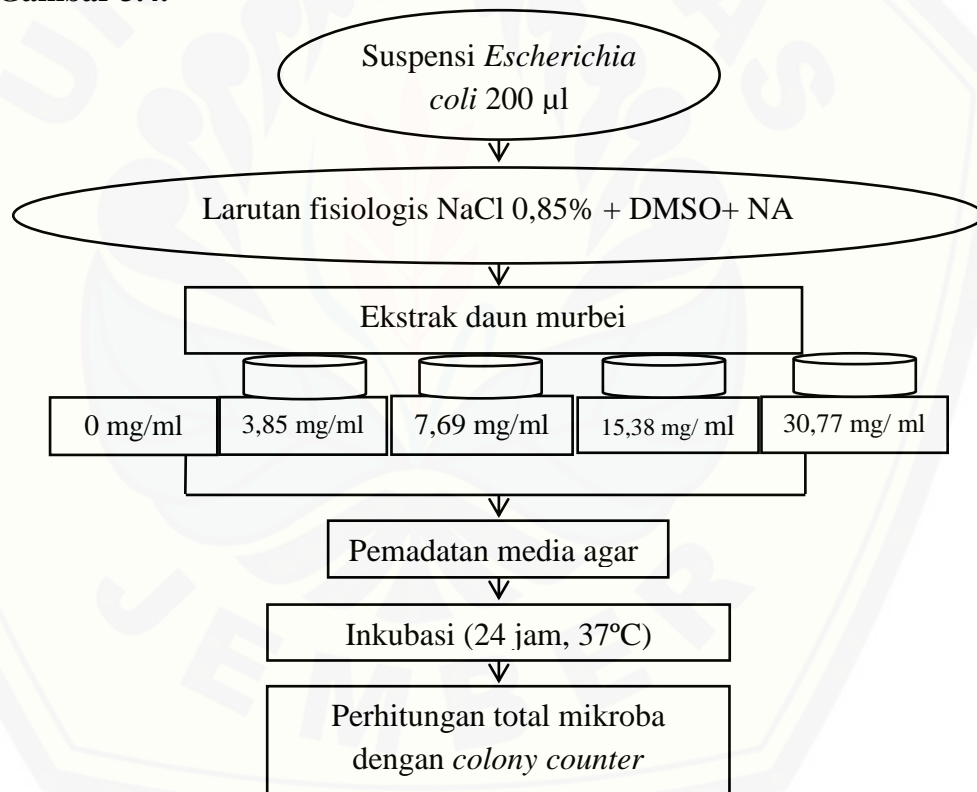
Langkah pertama yaitu pembuatan larutan stok dengan konsentrasi 20 % (2000 mg/ 10 ml) dengan cara dilakukan penimbangan serbuk ekstrak daun murbei sebanyak 2 gram dan dilarutkan dalam labu takar 10 ml dengan aquades steril. Larutan uji dibuat dalam berbagai konsentrasi 0 mg/ml; 3,85 mg/ml; 7,69 mg/ml; 15,38 mg/ml dan 30,77 mg/ml. Larutan stok yang telah dibuat, masing-masing diambil secara berturut-turut sebanyak 0, 100, 200, 400 dan 800 μ l. Setelah itu ditambahkan DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) masing-masing sebanyak 20 μ l dan larutan fisiologis berturut-turut adalah 980 μ l, 880 μ l 780 μ l, 580 μ l dan 180 μ l.

7) Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan penentuan KHM dan IC_{50} pada bakteri *Escherichia coli* dengan metode dilusi agar dengan menghitung jumlah koloni. Sebanyak 200 μ l suspensi bakteri yang telah dibuat dimasukkan ke dalam cawan petri. Larutan uji yang telah dibuat dengan berbagai konsentrasi dimasukkan ke dalam cawan petri yang terdapat

suspensi bakteri uji tersebut. Selanjutnya ditambahkan media NA yang masih hangat sebanyak 4 ml sehingga total volume 5,2 ml, diratakan dan dibiarkan hingga memadat kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada cawan petri menggunakan *colony counter*. KHM merupakan konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara optimal (90 %). IC₅₀ merupakan konsentrasi yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri sebanyak 50 % dari total koloni yang terdapat pada kontrol negatif. Secara umum, pengujian KHM dan IC₅₀ dapat dilihat pada **Gambar 3.4**.



Gambar 3.4 Diagram alir uji KHM dan IC₅₀

3.4 Analisa Data

Data yang telah diperoleh dibahas secara deskriptif disusun dalam tabel dan dimuat dalam bentuk grafik kemudian diinterpretasikan sesuai dengan pengamatan yang ada.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

- a. Pelarut etanol 100 % merupakan pelarut yang paling efektif dengan menghasilkan total polifenol ekstrak daun murbei tertinggi yakni sebesar 183,33 mg GAE/ml.
- b. Pelarut etanol 100 % merupakan pelarut yang paling efektif dengan menghasilkan persen penghambatan terhadap DPPH paling tinggi yakni sebesar 43,95 %.
- c. Ekstrak daun murbei terbukti berfungsi sebagai antibakteri terhadap *Escherichia coli*. Nilai KHM berdasarkan perhitungan kurva reguler sebesar 12,6 mg/ml dan IC_{50} sebesar 5,3 mg/ml. Nilai KHM berdasarkan perhitungan kurva logaritmik sebesar 11,43 mg/ml dan IC_{50} sebesar 3,44 mg/ml. Nilai KHM berdasarkan perhitungan kurva probit sebesar 11,37 mg/ml dan IC_{50} sebesar 4,50 mg/ml.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian ini, adanya kandungan polifenol dan aktivitas antioksidan diharapkan dapat diaplikasikan sebagai pangan fungsional untuk dijadikan sediaan ekstrak daun murbei maupun diaplikasikan sebagai pengawet alami pada suatu produk makanan terhadap bakteri pembusuk seperti *Escherichia coli*.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriani, R. 2010. "Aktivitas Antimikroba Madu dari Lebah Apis dorsata dan Apis mellifera Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*". Skripsi. Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Tanjungpura pontianak.
- Albuquerque A. J. R., Silva, P. M. F., Cavalcante, A. L. F. A. and Sampaio, F.C. 2013. *Polyphenols as A Source of Antimicrobial Agents against Human Pathogens*. ISBN: 978-1-62417-534-3. Brazil: Nova Science Publisher Inc.
- Anies. 2005. *Pencegahan Dini Gangguan Kesehatan: Berbagai Penyakit dan Gangguan Kesehatan yang Perlu Diwaspadai*. Jakarta: PT. Gramedia.
- Anita, A., Khotimah, S. dan Yanti, A. H. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Benalu Jambu Air (*Dendrothoe pentandra* (L.) Miq) terhadap Pertumbuhan *Salmonella typhi*. *Jurnal Protobiont*. 3 (2) : 268-272.
- Arisman. 2009. *Keracunan Makanan: Buku Ajar Ilmu Gizi*. Jakarta: EGC.
- Aulia. 2008. "Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanlik Daun Arbenan (*Duchesnea indica* (Andr.) Focke) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* Multiresisten Antibiotik Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya". Tidak diterbitkan. Skripsi. Surakarta. Universitas Muhammadiyah.
- Aziz, T., Cindo, R. K. N., dan Fresca, A. 2009. Pengaruh Pelarut Heksana dan Etanol, Volume Pelarut, dan Waktu Ekstraksi terhadap Hasil Ekstraksi Minyak Kopi. *Jurnal Teknik Kimia*. 16 (1): 1-8.
- Behrman, K. dan Arvin. *Ilmu Kesehatan Anak*. Penerjemah Samik Wahab. 2000. Jakarta: EGC.
- Betsy, T. Dan Koegh, J. 2005. *Microbiology Demystified*. US: McGraw-Hill Companies Inc.
- Brooks, G. F., Butel, J. S. dan Morse, S. A. 2004. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Dalimartha, S. 2008. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 1*. Jakarta: Trubus Agriwidya.

- Dewi, F.K. 2010. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (Morinda citrifolia L.) terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar*. Skripsi. FMIPA UNS.
- Farhoosh, R., Golmovahhed, G. A. and Khodaparast, M. H. 2007. Antioxidant activity of various extracts of old tea leaves and black tea wastes (*Camellia sinensis L.*). *Journal of Food Chemistry*. 100: 231-236.
- Fauci, A. S., Braunwald, E., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, L., Jameson, J. L. dan Loscalzo, J. 2008. *Harrison's Principle of Internal Medicine*. New York: Mc Graw-Hill.
- Febrinda, A. E., Astawan, M., Wresdiyati, T., dan Yuliana, N.D. 2013. Kapasitas Antioksidan dan Inhibitor Alfa Glukosidase Ekstrak Umbi Bawang Dayak. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. ISSN: 1979-7788. 24 (2): 161-167.
- Fitrianti, D., Noorhamdani, A. S. dan Karyono, S. S. 2011. Efektivitas Ekstrak Daun Ceplukan sebagai Antimikroba terhadap *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* In Vitro. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 2 (4): 212-215.
- Gordon, M., Pokorny, N., dan Yanishlieve. 2001. *Antioxsidants in Food*. New York: CRC Press.
- Hariana, A. 2008. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya Seri 2*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Hastuti, U. S., Oktantia, A., dan Khasanah, H. N. 2012. "Daya Antibakteri Daun dan Buah Murbei (*Morus alba L.*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae*". Skripsi. Malang: Biologi FMIPA Universitas Negeri Malang.
- Hutching, J. B. 1999. *Food Color and Appearance 2nd Edition*. Maryland: An Aspen Publishing.
- Ionica, M. E., Nour, V. dan Trandafir, I. 2012. Polyphenols Content and Antioxidant Capacity of Goji Fruits (*Lycium chinense*) as Affected By The Extraction Solvents. *South Western Journal of Holticulture, Biology and Environment*. 3 (2): 121-129.
- Irianty, R. S. dan Yenti, S. R. 2014. Pengaruh Perbandingan Pelarut Etanol-Air terhadap Kadar Tanin pada Sokletasi Daun Gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) *Jurnal Sagu*. ISSN 1412-4424. 13 (1): 1-7.
- Isdianti, F. 2007. "Penjernihan Ekstrak Daun Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) dengan Ultrafiltrasi Aliran Silang". Skripsi. Bogor : FTP IPB.

- Izzren, N. Q. and Fadzelly, M. 2013. Phytochemical and Antioxidant Properties of Different Part of *Camellia sinensis* leaves from Sabah Tea Plantation in Sabah, Malaysia. *International Food Research Journal*. 20 (1): 307-312.
- Kementerian Kesehatan RI. 2014. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2013*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Lay, B. W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: Rajawali Pers.
- Lestari, T., Nurmala, A. dan Nurmallasari, M. 2015. Penetapan Kadar Polifenol dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sintrong (*Crassocephalum crepidiodes* (Benth.) S. Moore). *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*. 13 (1): 107-112.
- Lima, G. P. P., Vianello, F., Correa, C. R., Campos, R. A .S., Borguini, M. G. 2014. Polyphenols in Fruits and Vegetables and Its Effect on Human Health. *Journal of Food and Nutrition Science*. 5: 1065-1082.
- Mardiah, E. 2011. Mekanisme Inhibisi Enzim Polifenol Oksidase pada Sari Buah Markisa dengan Sistein dan Asam Askorbat. *Jurnal Riset Kimia*. 4 (2): 32-37.
- Martin, E. A. 2012. *Kamus Sains*. Alih bahasa oleh Ahmad Lintang Lazuardi. Jakarta: Pustaka Pelajar.
- Musawwir. 2014. "Daya Hambat Antibakteri Daun Murbei (*Morus alba*) dan Penggunaannya Sebagai Konsentrat terhadap Performa Ayam Buras Petelur". Skripsi. Makassar : Fakultas Peternakan Universitas Hasannudin.
- Norris, J. R dan Ribbons, D. W. 1972. *Methods in Microbiology*. London and New York: Academic Press.
- Nurchayanti, A. D. R., Dewi, L. Dan Timotius, K. H. 2011. Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Polar dan Non Polar Biji Selasih (*Ocimum sanctum* Linn). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 12 (1): 1-6.
- Nurwanto dan Djarijah, A. S. 1997. *Mikrobiologi Pangan Hewani-Nabati*. Yogyakarta: Kasinius.
- Orphanides, A., Goulas, V. and Gekas, V. 2013. Effect of Drying Method on The Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Spearmint. *Czech Journal of Food Science*. 13 (5): 509-513.
- Pelczar, M. J dan Chan, E. C. S. 2005. *Mikrobiologi 2*. Jakarta: UI-Press.
- Permadi, A. 2006. *Tanaman Obat Pelancar Air Seni*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Pratiwi, S. T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.

- Rafsanjani, M. K. dan Putri, W. D. R. 2015. Karakteristik Ekstrak Kulit Jeruk Bali Menggunakan Metode *Ultrasonic Bath* (Kajian Perbedaan Pelarut dan Lama Ekstraksi). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3 (4): 1473-1480.
- Rahmawati, N., Fernando, A. dan Wachyuni. 2013. Kandungan Fenolik dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Gambir Kering (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb). *J. Ind.Che.Acta* ISSN 2085-0050. 4 (1).
- Rio, D. D., Mateos, A. R., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., and Crozier, A. 2013. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Comprehensive Invited Review*.
- Rosidah, A. N., Lestari, P. E., dan Astuti, P. 2014. Daya Antibakteri Ekstrak Daun Kendali (*Hipobroma langiflora* [L] G. Don) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa*.
- Rubenstein, D., Wayne, D., dan Bradley, J. *Lecture Notes: Kedokteran Klinis Edisi Keenam*. Alih bahasa oleh Annisa Rahmalia. 2007. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Salamah, N. dan Widyasari, E. 2015. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kelengkeng (*Euphoria longan* (L) Steud.) dengan Metode Penangkapan Radikal 2,2'-Difenil-1-Pikrilhidrazil. *Jurnal Pharmacia*. 5 (1): 25-34.
- Sayuti, K. dan Yenrina, R. 2015. *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Padang: Andalas University Press.
- Septiana, A. T. dan Asnani, A. 2012. Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat *Sargassum duplicatum* Menggunakan Berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi. *Jurnal Agrotek*. 6 (1): 22-28.
- Sethuramani, A., Devi, A., Jaslin, E., Meera R., and Kameswari, B. 2010. Pharmacognostical and Preliminary Phytochemical Investigation on the Leaves of *Morus alba* Linn. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. ISSN : 0975-1459. 2 (8): 513-517.
- Shui, L. G. 2002. An Investigation of Antioxidant Capacity of Fruits in Singapore Markets. *Journal of Food Chemistry*. 76: 69-75.
- Seidel, V. 2008. *Initial and Bulk Extraction*. In: Sarker, S. D., Latif, Z. and Gray, A. I., editors. *Natural Products Isolation*. 2nd Ed. New Jersey: Humana Press.

- Sunanto, H. 2009. *100 Resep Sembuhkan Hipertensi, Obesitas dan Asam Urat*. Jakarta: PT. Gramedia.
- Suryanto, E., Sastrohamidjojo, Raharjo, S. and Tranggono. 2004. Antiradical Activity of Andaliman (*Zanthoxylum achathopodium* DC) Fruit Extract. *Indonesian Food and Nutrition Progress*. 11 (1): 15-19.
- Susanti, A. 2009. "Inhibisi Ekstrak Air dan Etanol Daun Asam Jawa dan Rimpang Kunci Pepet Terhadap Lipase Pankreas Secara In Vitro". Skripsi. Bogor: FMIPA IPB.
- Syamsuni. 2006. *Farmasetika Dasar dan Hitungan Farmasi*. Jakarta: EGC.
- Tamat, S. R., T. Wikanta dan L. S. Maulina. 2007. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Rumput Laut Hijau (*Ulva reticulata* Forsskal). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 5 (1): 31-36.
- Thabti, I., Elfalledh, W., Hannachi, H., Ferchichi, A., dan Campos, M. D. C. 2012. Identification and Quantification of Phenolic Acids and Flavonol Glycosides in Tunisian Morus Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Journal of Functional Food*. 4:367-374.
- Tim Mikrobiologi FK Unibraw. 2010. *Bakteriologi Medik*. Surabaya: Putra Media Nusantara.
- Tsao, R. 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Journal of Nutrients*. ISSN 2072-6643. 2: 1231-1246.
- Utami, S. 2012. *Antibiotik Alami untuk Mengatasi Aneka Penyakit*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Volk, W. A dan Wheeler M. F. 1989. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Erlangga.
- Watson, R. R., Preedy, V. R., dan Zibadi, S. 2013. *Polyphenols in Human Health and Disease*. Amerika: Academic Press.
- World Health Organization (WHO). 2005. *Penyakit Bawaan Makanan: Fokus Pendidikan Kesehatan*. Alih bahasa oleh Andry Hartono. Jakarta : EGC.

Lampiran A. Penelitian Pendahuluan

Daun murbei tua dan muda segar, diekstrak menggunakan etanol dan di aduk menggunakan strirrer selama 3 jam, lalu diukur nilai absorbansi untuk mengetahui total polifenolnya.

Sampel	Ulangan	Absorbansi	variabel x	konstanta	x	konsentrasi bubuk (μM)	konversi	konsentrasi akhir (mg GAE/ml)	rata-rata	stdev
Tua	1	0,636	0,0003	0,1358	1667,333	83366,6667	0,17012	14,1823	14,8486	0,9423
	2	0,683	0,0003	0,1358	1824	91200,0000	0,17012	15,5149		
Muda	1	1,183	0,0003	0,1358	3490,667	174533,3333	0,17012	29,6916	27,4517	3,1677
	2	1,025	0,0003	0,1358	2964	148200,0000	0,17012	25,2118		

Daun murbei muda yang memiliki total polifenol tertinggi, diuji total polifenolnya antara sampel segar dan sampel kering

Sampel	Ulangan	Absorbansi	variabel x	konstanta	x	konsentrasi bubuk (μM)	konversi	konsentrasi akhir (mg GAE/ml)	rata-rata	stdev
Segar	1	1,008	0,0003	0,1358	2907,333	145366,6667	0,17012	24,7298	24,5880	0,2005
	2	0,998	0,0003	0,1358	2874	143700,0000	0,17012	24,4462		
Kering	1	3,325	0,0003	0,1358	10630,67	531533,3333	0,17012	90,4245	95,0602	6,5560
	2	3,652	0,0003	0,1358	11720,67	586033,3333	0,17012	99,6960		

Lampiran B. Warna Serbuk Ekstrak Daun Murbei

Perlakuan	Ulangan	Nilai L					Rata-rata	Nilai a					Rata-rata	Nilai B					Rata-rata
		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5	
Etanol 0%	1	40,7	42,6	40,5	45,7	43,6	42,62	1,5	1,1	4,1	3	2,8	2,5	8	7,2	12,2	11	11,2	9,92
	2	44,1	44,5	48,2	46,3	45,4	45,7	1,8	1,7	3,2	2,4	1,2	2,06	17,2	17,1	22,5	20,6	18,4	19,16
	3	43	44	44,2	45	44,3	44,1	2,9	2,3	2,5	1,6	2	2,26	16	17,4	16,4	18,7	17,2	17,14
Etanol 25%	1	39,9	39,4	41,6	42	42,3	41,04	2,4	2	2,9	6,8	4,7	3,76	8,4	9,3	8,5	15,5	13,2	10,98
	2	43,5	42,9	42,8	42,8	42,8	42,96	2,1	2	1,4	1,2	1,5	1,64	16	15	14,8	16,6	16,2	15,72
	3	41,7	42,1	41,6	41,3	42,4	41,82	3,3	3,3	3,5	3,3	5,6	3,8	14,3	14	14,2	14,4	14,3	14,24
Etanol 50%	1	38	36,4	37,8	37,3	38,1	37,52	1,8	1,5	1,7	1,2	2,7	1,78	9	9	7,6	8,6	8,6	8,56
	2	42,5	42,3	41,8	43,6	42,6	42,56	4,2	3,8	3,8	3,4	3,5	3,74	14,3	14,8	14,4	16,2	15,3	15
	3	40,7	42,9	42,2	41,5	41,5	41,76	3,1	3,4	3,3	2,6	3,4	3,16	14,1	13,2	14,7	14,1	7,3	12,68
Etanol 75%	1	31	32,7	33,2	32,5	32	32,28	2	2,1	2	1,6	1,7	1,88	10,7	10,8	11,3	10,5	10,4	10,74
	2	36,8	37,4	37	35,2	36,3	36,54	4	3,9	4,5	4	4,2	4,12	13,2	12	11,8	12,6	11,8	12,28
	3	35,7	36	33,6	36,2	36,9	35,68	4	4,2	4,5	4	4,2	4,18	12	11,7	12,4	12,4	12,5	12,2
Etanol 100 %	1	28,4	26,9	27,8	26,8	27,8	27,54	1,8	1,8	1,6	1,7	2,5	1,88	10,4	10,3	10,7	10,3	10,7	10,48
	2	29,8	30,7	30,7	30,2	31	30,48	4,3	3,4	3,6	3,4	4,5	3,84	12,1	12	12,6	12,3	12,1	12,22
	3	33,7	33,1	35	34,8	35,5	34,42	4	4,2	3,6	3,7	3,4	3,78	12,7	12,5	14,7	14,7	11,3	13,18

Nilai Kecerahan Serbuk Ekstrak Daun Murbei

Perlakuan	L	Stdev
Etanol 0 %	44,14	1,54
Etanol 25 %	41,94	0,97
Etanol 50 %	40,61	2,71
Etanol 75 %	34,83	2,25
Etanol 100 %	30,81	3,45

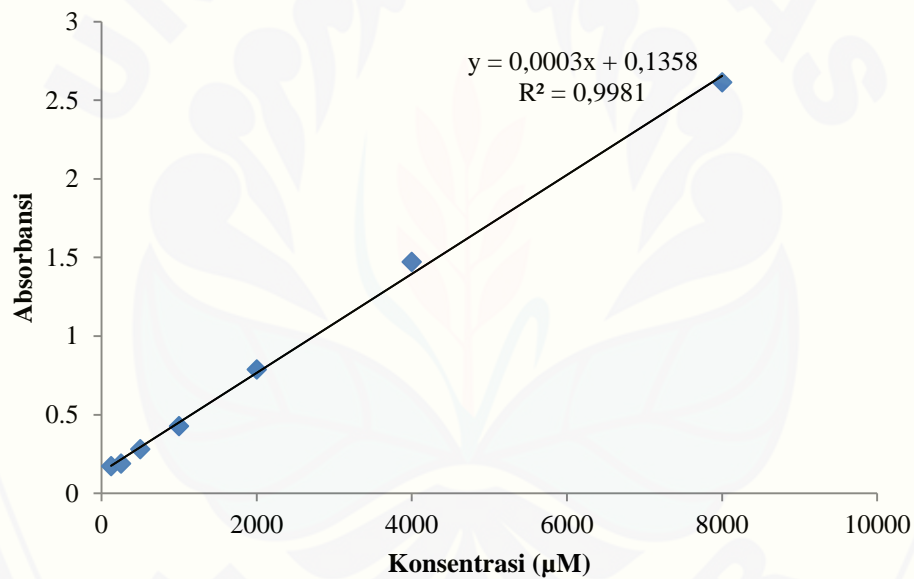
Nilai Derajat Hue Serbuk Ekstrak Daun Murbei

Perlakuan	Ulangan	L	a	b	Hue	Rata-rata	stdev
Etanol 0%	1	42,62	2,50	9,92	104,14	99,26	4,2823
	2	45,70	2,06	19,16	96,14		
	3	44,10	2,26	17,14	97,51		
Etanol 25%	1	41,04	3,76	10,98	108,90	103,27	6,6342
	2	42,96	1,64	15,72	95,96		
	3	41,82	3,80	14,24	104,94		
Etanol 50%	1	37,52	1,78	8,56	101,75	103,25	1,2991
	2	42,56	3,74	15,00	104,00		
	3	41,76	3,16	12,68	103,99		
Etanol 75%	1	32,28	1,88	10,74	99,93	105,80	5,0845
	2	36,54	4,12	12,28	108,55		
	3	35,68	4,18	12,20	108,91		
Etanol 100 %	1	27,54	1,88	10,48	100,17	104,54	3,8519
	2	30,48	3,84	12,22	107,44		
	3	34,42	3,78	13,18	106,00		

Lampiran C. Perhitungan Total Polifenol Serbuk Ekstrak Daun Murbei

Kurva Standard Asam Galat

Konsentrasi (μM)	Absorbansi
125	0,173
250	0,19
500	0,282
1000	0,428
2000	0,789
4000	1,473
8000	2,615



Total Polifenol Serbuk Ekstrak Daun Murbei

Sampel	Ulangan	Absorbansi	variabel x	Konstanta	x	Konsentrasi bubuk (μM)	Konversi	Konsentrasi Akhir (mg GAE/ml)	Rata-rata	stdev
Etanol 0%	1	0,246	0,0003	0,1358	367,3333	183666,6667	0,00017012	31,2454	33,7027	2,9100
	2	0,266	0,0003	0,1358	434,0000	217000	0,00017012	36,9160		
	3	0,252	0,0003	0,1358	387,3333	193666,6667	0,00017012	32,9466		
Etanol 25%	1	0,292	0,0003	0,1358	520,6667	260333,3333	0,00017012	44,2879	42,4922	2,2023
	2	0,288	0,0003	0,1358	507,3333	253666,6667	0,00017012	43,1538		
	3	0,277	0,0003	0,1358	470,6667	235333,3333	0,00017012	40,0349		
Etanol 50%	1	0,355	0,0003	0,1358	730,6667	365333,3333	0,00017012	62,1505	63,7572	2,0900
	2	0,369	0,0003	0,1358	777,3333	388666,6667	0,00017012	66,1200		
	3	0,358	0,0003	0,1358	740,6667	370333,3333	0,00017012	63,0011		
Etanol 75%	1	0,461	0,0003	0,1358	1084,0000	542000	0,00017012	92,2050	92,8666	3,3106
	2	0,453	0,0003	0,1358	1057,3333	528666,6667	0,00017012	89,9368		
	3	0,476	0,0003	0,1358	1134,0000	567000	0,00017012	96,4580		
Etanol 100%	1	0,785	0,0003	0,1358	2164,0000	1082000	0,00017012	184,0698	183,8808	5,3896
	2	0,765	0,0003	0,1358	2097,3333	1048666,667	0,00017012	178,3992		
	3	0,803	0,0003	0,1358	2224,0000	1112000	0,00017012	189,1734		

Lampiran D. Nilai Aktivitas Antioksidan Serbuk Ekstrak Daun Murbei

Sampel	Ulangan	Blanko	Absorbansi	% penghambatan	Rata	stdev
Etanol 0 %	1	2,351	1,987	15,4828	16,8345	1,2861
	2	2,422	1,985	18,0429		
	3	2,303	1,912	16,9779		
Etanol 25 %	1	2,351	1,922	18,2476	18,7043	2,0797
	2	2,422	1,914	20,9744		
	3	2,303	1,914	16,8910		
Etanol 50 %	1	2,351	1,748	25,6487	26,1244	2,0447
	2	2,422	1,735	28,3650		
	3	2,303	1,742	24,3595		
Etanol 75 %	1	2,351	1,516	35,5168	36,1386	0,5739
	2	2,422	1,544	36,2510		
	3	2,303	1,459	36,6479		
Etanol 100 %	1	2,351	1,348	42,6627	43,9455	1,2698
	2	2,422	1,357	43,9719		
	3	2,303	1,262	45,2019		

Lampiran E. Perhitungan Konsentrasi Hambat MinimumJumlah Koloni *Eschericia coli*

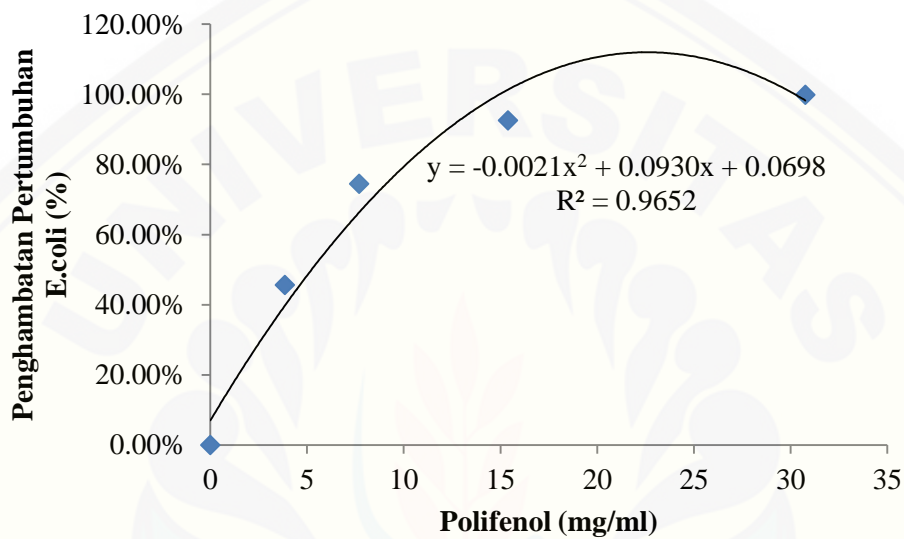
Polifenol (mg/ml)	Jumlah koloni/200µl (U1)	Jumlah koloni/200µl (U2)	Jumlah koloni/200µl (U3)	rata-rata	SD
0	716	684	692	697,33	16,65
3,85	367	380	401	382,67	17,16
7,69	156	122	104	127,33	26,41
15,38	45	59	52	52,00	7,00
30,77	0	1	3	1,33	1,53

Jumlah Koloni *Eschericia coli* dalam CFU/ml

Polifenol (mg/ml)	jumlah koloni (CFU/ml) (U1)	jumlah koloni (CFU/ml) (U2)	jumlah koloni (CFU/ml) (U3)	rata-rata (CFU/ml)	log jumlah koloni	SD	% penghambatan
0	35800000,00	34200000,00	34600000,00	34866666,67	8,542	8326664,00	0,00%
3,85	18350000,00	19000000,00	20050000,00	19133333,33	8,282	8578072,82	45,12%
7,69	7800000,00	6100000,00	5200000,00	6366666,67	7,804	13203534,88	81,74%
15,38	2250000,00	2950000,00	2600000,00	2600000,00	7,415	3500000,00	92,54%
30,77	0,00	50000,00	150000,00	66666,67	5,824	763762,62	99,81%

Kurva Reguler Penghambatan Pertumbuhan *Eschericia coli*

Polifenol (mg/ml)	% Penghambatan
0	0,00%
3,85	45,67%
7,69	74,51%
15,38	92,54%
30,77	99,81%



$y = -0,0021x^2 + 0,0930x + 0,0698$ $50\% = -0,0021x^2 + 0,0930x + 0,0698$ $0,5 = -0,0021x^2 + 0,0930x + 0,0698$	$y = -0,0021x^2 + 0,0930x + 0,0698$ $90\% = -0,0021x^2 + 0,0930x + 0,0698$ $0,9 = -0,0021x^2 + 0,0930x + 0,0698$
<hr/> $X^2 - 44X + 205$ $(X - 5,3) (X - 38,7)$	<hr/> $X^2 - 44X + 395$ $(X - 12,6) (X - 31,4)$
$X1 = 5,3 \text{ mg/ml}$ $X2 = 38,7 \text{ mg/ml}$	$X1 = 12,6 \text{ mg/ml}$ $X2 = 31,4 \text{ mg/ml}$

$$y = -0,0021x^2 + 0,0930x + 0,0698$$
$$50\% = -0,0021x^2 + 0,0930x + 0,0698$$
$$0,5 = -0,0021x^2 + 0,0930x + 0,0698$$

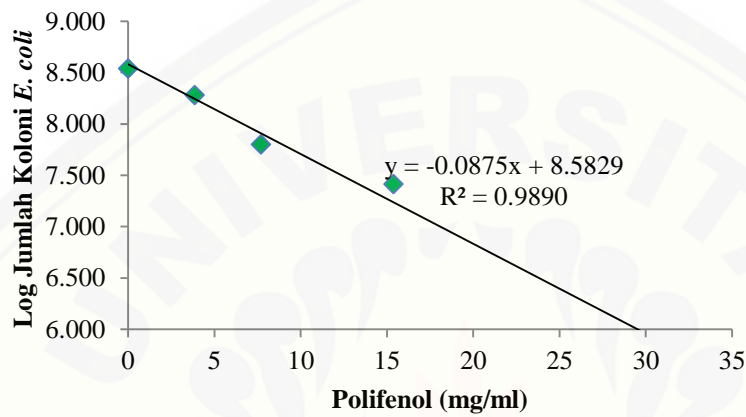
a	-0,0021	
b	0,0930	
c	0,0698	
x	5,3000	IC₅₀ = 5,3 mg/ml

$$y = -0,0021x^2 + 0,0930x + 0,0698$$
$$90\% = -0,0021x^2 + 0,0930x + 0,0698$$
$$0,9 = -0,0021x^2 + 0,0930x + 0,0698$$

a	-0,0021	
b	0,0930	
c	0,0698	
x	12,6	IC₉₀ = 12,6 mg/ml
function	0,8384	

Kurva Logaritmik Perhitungan Pertumbuhan *Eschericia coli*

Polifenol (mg/ml)	Log jumlah koloni
0	8,542
3,85	8,282
7,69	7,804
15,38	7,415
30,77	5,824



			Kons. Polifenol (mg/ml)
1 log	7	18,0903	11,4286
	6	29,5189	
2 log	7	18,0903	22,8571
	5	40,9474	
3 log	7	18,0903	22,8571
	5	40,9474	

IC 50%		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10 ⁸	Log Y1 = 8,0000	X1 =	6,93103
Y2 = 50% (Y1) = 5 x 10 ⁷	Log Y2 = 7,6990	X2 =	10,5105
		IC ₅₀ =	3,58

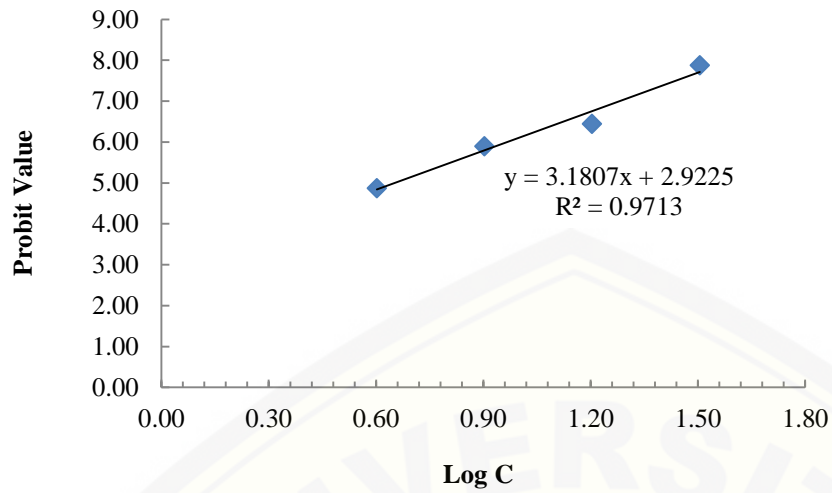
IC 90%		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10 ⁸	Log Y1 = 7,0000	X1 =	18,8216
Y2 = 90% (Y1) = 5 x 10 ⁷	Log Y2 = 6,0000	X2 =	30,7122
		IC ₉₀ =	11,89

Kurva Probit Penghambatan Pertumbuhan *Eschericia coli*

Polifenol (mg/ml)	rata-rata (CFU/ml)	Log	% Pertumbuhan	%Penghambatan	Log C	Probit
0	3,49E+08	8,542	100,00	0,00	0,00	0,00
4	1,91E+08	8,282	54,88	45,12	0,60	4,87
8	6,37E+07	7,804	18,26	81,74	0,90	5,90
16	2,60E+07	7,415	7,46	92,54	1,20	6,45
32	6,67E+05	5,824	0,19	99,81	1,51	7,88

Tabel Transformasi Persentase probit

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	--	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,76	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,23	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,77	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	6,18	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
--	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	8,09



$$Y = 3,1807x + 2,9225$$

$$5 = 3,1807x + 2,9225$$

$$5 - 2,9225 = 3,1807x$$

$$2,0775 = 3,1807 X$$

$$X = \text{Log } C_{50} = 2,0775/3,1807 = 0,6532$$

$$\text{LOG } C_{50} = 0,6532$$

$$\text{IC}_{50} \text{ (mg/ml)} = 4,50$$

$$Y = 3,1807x + 2,9225$$

$$6,28 = 3,1807x + 2,9225$$

$$6,28 - 2,9225 = 3,1807x$$

$$3,3575 = 3,1807 X$$

$$X = \text{Log } C_{90} = 3,3575/3,1807 = 1,0556$$

$$\text{LOG } C_{90} = 1,0556$$

$$\text{IC}_{90} \text{ (mg/ml)} = 11,37$$

Lampiran F. Dokumentasi Foto Penelitian



Daun murbei segar



Daun murbei kering



Penghancuran daun murbei



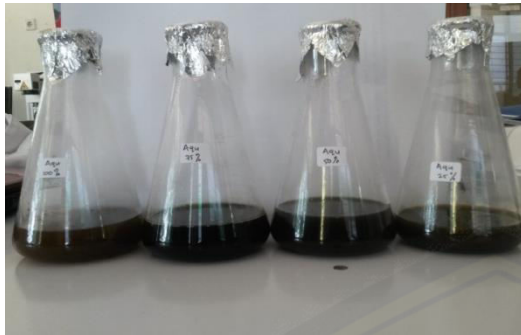
Serbuk daun murbei



Ekstraksi sebelum *shaker waterbath*



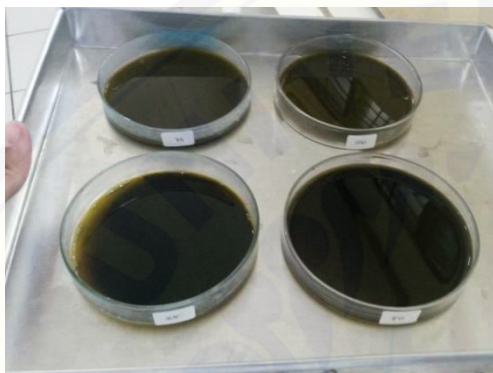
setelah dikeluarkan *shaker waterbath*



Ekstrak setelah penyaringan



Penguapan pelarut dengan rotary evaporator



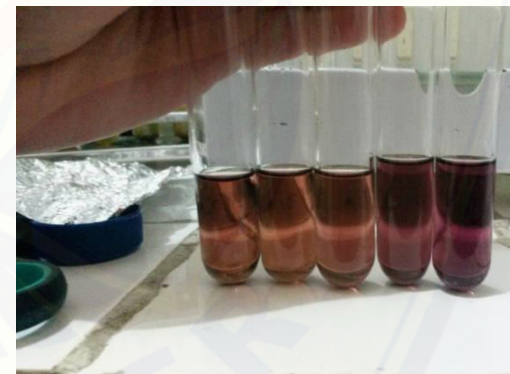
Pengeringan dengan oven vakum



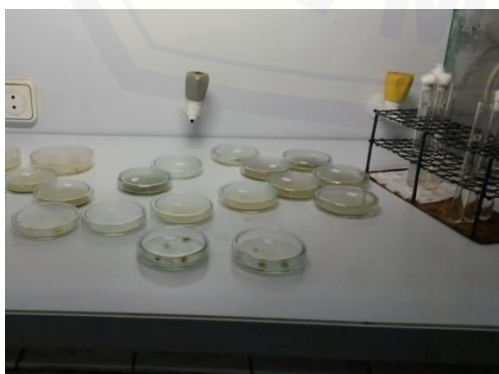
Serbuk ekstrak daun murbei



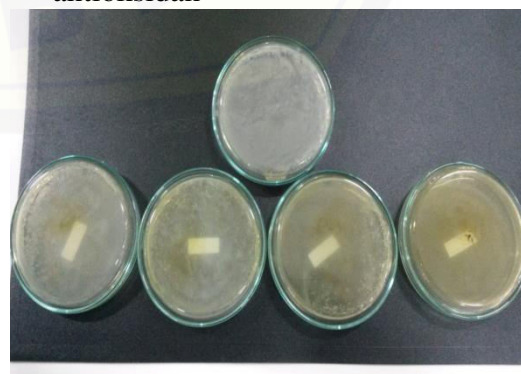
Pengukuran warna serbuk ekstrak



Pengukuran total polifenol dan antioksidan



Persiapan uji antibakteri



Uji antibakteri